

На правах рукописи
УДК 57.083.3:577.152.314:576.312.31:577.213

АБРАМОВА Зинаида Ивановна

**ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА:
СВОЙСТВА, СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И
БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ**

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

З. Абрамова

Казань - 1999

Работа выполнена в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Казанского государственного университета имени В.И. Ульянова-Ленина.

Научный консультант: доктор биологических наук,
профессор Винтер В.Г.

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
академик РАМН Березов Т.Т.
доктор биологических наук,
Потапова Галина Ивановна
доктор биологических наук,
Ребров Леонид Борисович

Ведущее учреждение: Институт молекулярной биологии
Российской академии наук

Защита состоится 17 мая 1999 г. в 14 часов на заседании диссертационного Совета Д.001.02.01 при научно-исследовательском институте питания РАМН. (109240, г. Москва, Устьинский проезд, 2/4)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке.

Реферат разослан " ____ " _____ 199__ г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
кандидат медицинских наук

Жминченко В.М.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Постоянный интерес к изучению белков ядер клеток эукариот связан с тем, что они относятся к группе соединений, которые играют важную роль в поддержании структуры хроматина и регуляции его генетических функций. Имеется значительное количество работ, посвященных выделению, очистке и структурному анализу ядерных белков, результаты которых способствовали переходу к следующему этапу в изучении этих белков - выяснению их ферментативной активности и участия в работе генетического аппарата клетки.

Данная работа посвящена изучению дезоксирибонуклеаз хроматина печени крыс и эмбрионов морского ежа в норме и при пролиферации клеток.

Дезоксирибонуклеазы - это многочисленная группа ферментов, которые специфичны по отношению к ДНК и расщепляют межнуклеотидные связи в молекуле ДНК с образованием фрагментов различной величины (К.Д.З.1.4.х.).

В настоящее время относительно хорошо изучены ДНКазы бактерий и фагов. Развитие молекулярной биологии способствовало выяснению роли отдельных ДНКаз бактерий в процессах репликации, репарации, рекомбинации и рестрикции (Татарская, 1976; Brown et al., 1982; Краевский, Куханова, 1986). Много работ посвящено изучению ДНКаз эукариот (Geanta et al., 1976; Bambara et al., 1990; Campbell, Newlon, 1991; Villar et al., 1991; Кирпонос и др., 1993 и др.). Среди них наиболее хорошо изучена ДНКаз I, исследование которой началось в пятидесятых годах (Kunitz, 1950); получены высокоочищенные препараты этого фермента, выращены кристаллы, проведен широкий спектр физико-химических исследований, установлена первичная структура белка, возможная биологическая роль (Laskowski, 1971; Lacks, 1981; Takeshita et al., 1995; Kishi, Yasuda, 1996).

В отношении ДНКаз ядер клеток эукариот наши знания ограничиваются, в основном, обнаружением ферментов в белках хроматина и изучением их наиболее общих свойств: отношение к субстрату, оптимум pH, активаторы. Мало конкретных данных о функции ДНКаз ядер. Отставание наших знаний относительно ДНКаз эукариот можно объяснить тем, что в случае с клетками эукариот нельзя использовать метод получения мутантов, имеющих недостаточность по синтезу определенных ферментов. Как известно, этот метод сыграл ведущую роль в установлении биологической роли многих ДНКаз бактерий.

Сложность исследования хроматин-ассоциированных ДНКаз эукариот связана с их нестабильностью, методическими трудностями при выделении и очистке (Lambert, Lambert, 1988). Тем не менее имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что и в случае эукариот, физиологическая роль ДНКаз состоит в поддержании генетического гомеостаза дифференцированных клеток.

Полагают, что именно нарушение функций ДНКаз является одной из причин возникновения злокачественного роста (Kurnik, Kern, 1962; Spandidos et al., 1980; Bytnes, Bradley, 1991; Tan et al., 1992; Dosne de Pasqualini Ch., 1994; McConkey et al., 1995), лучевой болезни (Иванник и др., 1978; Пухова, 1989; Рябенко и др., 1991; Hibino et al., 1992), болезней энзимопатий (Михельсон, 1989), старения (Batler et al., 1987; SuVarchala et al., 1991; Хансон, 1994; Михельсон, 1995) и апоптоза (Duval, Wyllie, 1986; Compton, Cidlovski, 1987; Gaido, Cidlovski, 1991; Szopa, Adamic, 1993; Tanuma, Shiokawa, 1994; Khodarev et al., 1995; Enari et al., 1998; Wyllie, 1998).

Согласно современной точке зрения многочисленные нарушения в организме могут быть связаны с подавлением апоптоза, который является нормальным физиологическим процессом (Dosne de Pasqualini Ch., 1994). Показано, что первым и важнейшим этапом

апоптоза является активация нуклеаз, которая ведет к специфическому гидролизу ДНК. Предполагается, что при апоптозе происходит либо активация конститутивно экспрессирующихся ядерных ДНКаз, связанных с ядерным матриком (Duvall, Willie, 1986; Szopa, Adamic, 1993), либо синтезируются новые специфические "апоптотические" нуклеазы (Compton, Cidlovski, 1987; Gaido, Cidlovski, 1991; Enari et al., 1998). Ходарев с соавторами (Khodarev et al., 1995) отметили, что низкая активность ядерной Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы в трансформированных клетках, возрастает при переходе этих клеток к апоптозу, поэтому авторы высказали предположение, что уменьшение активности фермента в трансформированных клетках может содействовать поддержанию (сохранению) клеточной вариабельности путем уменьшения гибели клеток по механизму апоптоза.

Наличие в клетках эукариот дискретного ядра и большого количества органоидов особо остро ставит вопрос о внутриклеточной локализации ДНКаз, которая в значительной степени определяет роль данного фермента в клетке. В настоящее время в ядрах клеток эукариот обнаружены ДНКазы существенно различающиеся по своим свойствам: характеру действия на субстрат, отношению к активаторам, ингибиторам, оптимуму pH. Это предполагает, что на каждом этапе метаболизма ДНК в хроматине может участвовать определенная ДНКаза.

Все это позволяет считать, что изучение ДНКаз, определение их внутриклеточной локализации и раскрытие механизмов регуляции их активности будет способствовать разработке путей нормализации функционирования клеток в процессе роста и развития организма.

Работа проводилась в соответствии с планом научно-исследовательских работ лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Казанского государственного университета. Основные положения данной диссертации легли в основу программы работ лаборатории в 1991-1995 гг. "Роль ДНКаз хроматина и ДНК-связывающих белков в репликации ДНК" (Казанский ун-т.: отв. исполнитель З.И. Абрамова.-№ Г.Р. 01960009308, инв. № 029600093).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение ДНКазной активности белков хроматина печени крыс и морского ежа в процессе роста и развития организма. В соответствии с основной целью были поставлены задачи:

1. Разработать препаративный и аналитический методы выделения ДНКаз из хроматина ядер у животных различных возрастных групп.
2. Выделить гомогенные препараты Mn^{2+} -зависимой ДНКазы и Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы.
3. Получить поликлональные моноспецифические антитела к ДНКазам.
4. Синтезировать специфические конъюгаты антител с электронно-плотными маркерами (ферритином и коллоидным золотом).
5. Методом электронной иммунофлуоресценции определить локализацию ДНКаз в структурах хроматина и характер взаимодействия ДНКаз с ДНК.
6. Изучить участие ДНКаз хроматина в синтезе ДНК.
7. Изучить влияние ДНК-связывающих белков хроматина на активность ДНКаз ядер.
8. Изучить динамику активности ДНКаз в пролиферирующих клетках и при старении организма.

Научная новизна. Впервые исследованы субклеточная локализация и физико-химические свойства ДНКаз белков хроматина и их роль в регуляции роста и деления клеток.

Получены принципиально новые данные о локализации Mn^{2+} -зависимой ДНКазы в структурах хроматина. Впервые показано, что ДНКаза распределена по всей нити хроматина и обнаруживается как в нуклеосомах, так и линкерной ДНК.

Содержание ДНКазы в хроматине зависит от возраста животных. Наибольшее количество, в процентном отношении, содержится в хроматине ядер из регенерирующей печени молодых животных. По мере развития и старения организма содержание ДНКазы снижается.

Активность Mn^{2+} -зависимой ДНКазы зависит от физиологического состояния клеток: максимальная активность фермента наблюдается в покоящихся клетках печени старых животных, наиболее низкой активностью характеризуются пролиферирующие клетки печени молодых животных.

Установлено, что факторы, повреждающие ДНК в области *origin*, могут инициировать "внеплановый" синтез ДНК. Этими факторами могут быть как экзогенные факторы - химические мутагены, γ -облучение, так и эндогенные - ДНКазы хроматина.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что ДНКазы хроматина играют важную роль в регуляции роста и деления клеток.

Полученные данные являются одним из подходов для выяснения молекулярных механизмов, регулирующих *in vivo* обратимость переходов структуры макромолекул ДНК от состояния стабильности к нестабильности и обратно.

Научно-практическая значимость. Разработаны методы очистки ДНКаз, и электрофоретические методы изучения ДНКаз *in situ*. Изучены физико-химические свойства Mn^{2+} -зависимой ДНКазы, что позволяет приступить к выяснению роли исследуемой ДНКазы в регуляции деятельности генетического аппарата животных различных возрастных групп.

Материалы диссертации и методические приемы внедрены в учебный процесс кафедры биохимии Казанского университета в виде практического курса в рамках большого практикума: "Гидродинамические методы в биохимии и молекулярной биологии. Седиментация" и "Разделение и идентификация веществ. Хроматография".

Апробация работы. Основные результаты докладывались на Всесоюзных симпозиумах "Структура и функции клеточного ядра" (Пушино, 1984; г. Черногоровка, 1987; Москва, 1990); на VIII-ом объединенном симпозиуме Биохимических обществ СССР-ГДР "Проблемы современной биохимии и биотехнологии" (г. Рига, 1985); на Всесоюзной конференции "Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование" (г. Рига, 1985); на V-ом Всесоюзном биохимическом съезде (г. Киев, 1986); на II-ом съезде Биохимического общества Российской академии наук (г. Москва, 1997); на Итоговых научных конференциях КГУ (г. Казань, 1981-1997г.); на II-ом Международном симпозиуме "Молекулярная и клеточная регуляция активных ферментов" (ГДР, г. Гале, 1986); на XVII-ом Биохимическом съезде ГДР (ГДР, г. Лейпциг, 1987); на Международных биохимических конгрессах (ЧССР, г. Прага, 1988; Швейцария, г. Базель, 1995); на Евроазиатском симпозиуме по биотехнологии (Турция, г. Анкара, 1995).

Публикации. Основные результаты изложены в 29 печатных работах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения (3 стр.), обзора литературы (79 стр.), описания материалов и методов (31 стр.), изложения собственных результатов (190 стр.), их обсуждения и выводов (57 стр.). Диссертация изложена на 424 стр., содержит 136 рис. и 34 табл. Без таблиц, рисунков и списка литературы диссертация составляет 245 стр. машинописного текста. Библиография (57 стр.) включает 620 источников, из них - 175 отечественных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах, весом 150-200 г и морских ежей *Strongylocentrotus intermedius*. Для получения иммунных сывороток использовали кроликов породы Шиншилла, весом 2-3 кг.

Частичную гепатозектомию животных проводили под общим эфирным наркозом по методу (Higgins, Anderson, 1931), удаляя 70% от общей массы органа. Ядра из нормальной печени крыс и эмбрионов морского ежа выделяли по методу (Dounse, Ickowicz, 1969) с некоторыми модификациями, позволяющими получать чистые ядра, свободные от цитоплазматических загрязнений.

Препараты ДНКаз получали экстракцией хроматина 10-кратным объемом 0,4 М NaCl в трис-буфере, соответствующего pH (фракция 0,4). В дальнейшем Mn^{2+} -зависимую ДНКазу очищали адсорбционной хроматографией на оксипатите и препаративным изоэлектрофокусированием (ИЭФ); Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимую ДНКазу из фракции 0,4 очищали ионообменной хроматографией на Servacel-DE-23 (DEAE-целлюлозе). Активность ферментов выражали в спектрофотометрических единицах увеличения кислотности продуктов при гидролизе ДНК при длине волны 260 нм за 60 мин инкубации при 37°C на 1 мг белка (удельная активность) или на 1 мл ферментного раствора (общая активность).

Синтез сорбентов ДНК-целлюлоза проводили по методу (Litman, 1971). ДНК связывающие белки выделяли по методу (Herrick, Alberts, 1974) на сорбентах нативная ДНК-целлюлоза, с некоторыми модификациями. В частности ДНК-связывающие белки выделяли из фракции 0,4 хроматина ядер.

Электрофорез белков фракции 0,4 хроматина, ферментов и ДНК-связывающих белков проводили в 12% или 15% - ном полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем додецилсульфат натрия (ДДС). Запасной раствор ПААГ содержит Т- 30, С-2,7 (Laemmli, 1970). Электрофорез вели на приборе с вертикальным гелем типа АВГЕ-1, р/к "Хийу Канлур" (Эстония). Окраску гелей серебром вели по методу (Oakley et al., 1980). Одномерный электрофорез и иммуноэлектрофорез ДНКаз, антител и конъюгатов антител с электронно-плотными маркерами проводили по методу (Grabar, Williams, 1955) на приборе фирмы "Corning" (Англия). Электрофорез ДНК и ДНК-связывающих белков в 1%-ном агарозном геле вели по методу, описанному Маниатисом (1984). Для доказательства моноспецифичности антисывороток использовали метод иммуноблотинга (электроперенос белков в сочетании с иммуноферментным анализом) (Tsang et al., 1988).

При определении количественного изменения ДНКаз во фракции белков хроматина использовали метод иммуноферментного анализа (ИФА).

Антисыворотки к ДНКазам получали путем четырехкратного введения препаратов фермента (250-300 мкг на кролика) в область шеи и позвоночника. Реиммунизацию проводили через 30 дней. Специфические антитела к нейтральной Mn^{2+} -зависимой ДНКазе и Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазе выделяли из соответствующих антисывороток ионообменной хроматографией (элюция 0,0175 М фосфатным буфером, pH 6,3). Антитела метили электронно-плотными маркерами - ферритином (Singer, 1963) и коллоидным золотом (Frens, 1973).

Препараты активного хроматина получали спредингом ядер по методу Миллера в модификации Лабхарта и Коллера (Labchart, Koller, 1981). Спрединг ядер - это метод, который позволяет деконденсировать хроматин при помещении ядер в раствор с низкой ионной силой и при повышенном pH. Деконденсированные ядра центрифугировали на электронно-микроскопические сетки через слой сахарозы, содержащей фиксатор при комнатной температуре в течение 20 мин, при 4000 g.

При электронном иммуно-гистохимическом исследовании субклеточной локализации ДНКаз использовали метод Пайнтера (Painter et al., 1973). Ткани различных органов фиксировали в глутаровом альдегиде, в ряде случаев с последующей фиксацией в осмиевом фиксаторе, обезжировали спиртами в возрастающих концентрациях, пропитывали смолами, содержащими ацетон или окись пропилена, и заливали в ЭПОН. Эпоновые срезы тканей или раствор ДНК наносили на электронно-микроскопические сетки-подложки, укрепленные коллоидной пленкой. Препараты обрабатывали БСА и конъюгатом специфических антител с электронно-плотным маркером. На контрольных препаратах образцы предварительно обрабатывали специфическими антителами, затем специфическим конъюгатом.

Иммунофлюоресцентное окрашивание полутонких замороженных срезов проводили по методу Кунса (Coons, 1959).

Синтез конъюгатов антител с ферритином проводили с помощью 4,4-дифтор-3,3-динитродифенил сульфата (ФНФС) (Sri Ram et al., 1963) и глутарового альдегида. Связывание ферритина (Fe) с антителами (IgG) осуществляется в результате ковалентного взаимодействия апобелковой оболочки Fe с IgG в присутствии комплексообразующих агентов.

Синтез конъюгатов антител с коллоидным золотом. Коллоидное золото - это отрицательно заряженные гидрофобные частицы, которые в строго контролируемых условиях pH и концентрации антител адсорбируют последние через аминогруппы в результате нековалентного взаимодействия (Goodman et al., 1981). Для восстановления Au^{3+} до Au мы использовали цитрат натрия, который способен индуцировать формирование частиц коллоидного золота с различным диаметром. Для получения раствора коллоидного золота с диаметром частиц 20 нм (Au_{20}) мы добавляли 1,5 мл 1%-ного раствора цитрата Na марки х.ч. Оптимальный pH среды и количество белка (IgG) устанавливали по методу (Horisberger, 1975) или (Gergheggan, Ackerman, 1977), в основе которых лежит тест Зигмонди (Zygmody, 1925) - агрегация частиц при добавлении электролита, которая выражается в изменении цвета коллоида от красно-оранжевого до синего.

Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме "Ultratom V" (ЛКБ, Швеция), окрашивали цитратом свинца и уранилацетатом (Reynolds, 1961). Электронно-микроскопические препараты просматривали в электронных микроскопах Tesla BS-500, Philips 400 T/S, JEM-100B.

Для количественного определения связанного конъюгата на срезах подсчитывали количество частиц золота (N_1) на площади (S) и рассчитывали плотность метки (N) по формуле $N=N_1/S$ (Weibel, 1969). Полученные экспериментальные данные обрабатывали согласно общепринятым методам (Плохинский, 1978).

Процент ДНК-синтезирующих ядер определяли радиоавтографией, используя метку $[^3H]dTTP$ и $[^3H]dCTP$ (10 мКи/мл). Для изолирования хроматина, активно синтезирующего ДНК, от основной массы хроматина, применяли метод с использованием гидродинамического фрагментирования ДНП, центрифугированием в нейтральном градиенте сахарозы (Majumdar et al., 1981). Ядра лизировали в 50 мМ трис-буфере (pH 8,0), после многократной отмывки лизата системой буферов нуклеопротейный гель оставляли на 12 ч в холодильнике для набухания, после набухания гель гомогенизировали и наносили на ступенчатый градиент 0,1-2,9 М сахарозы. Центрифугирование вели в течение 45 мин при 20000 об/мин на центрифуге Beckman, используя ротор SV-41. Для депротенирования фрагментов ДНК, включающих радиоактивную метку, добавляли лаурилсаркозинат натрия, проназу. Пробы наслаивали на линейный градиент концентрации сахарозы объемом 4,8 мл (5-20 %), содержащий 0,9 М NaOH. Центрифугирование проводили в течение 10 ч (15°C) при 38000 об/мин на центрифуге VAC-602, используя ротор SV-41.

Очистка Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы эмбрионов морского ежа

Стадия очистки	Объем, мл	Белок:			Выход:			Активность ДНКазы			Степень очистки	
		коп-я, мг/мл	сум-ная, мг	сум-ная, ед/мл	%	сум-ная, ед/объем	%	сум-ная, ед/объем	%	удель-я ед/мг белка		
Экстракция хроматина ядер 10 mM трис-HCl (pH 7.5), 0.4 M NaCl (фракция 0.4)	200	12	2400	20	100	40000	100	40000	100	16.4	1	
Осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80% насыщение), обессоливание на сефадексе G-25 в ТЭК-буфере (pH 7.5), 5% глицерина	500	1.4	700	72	29	36000	90	36000	90	52	3	
Хроматография на колонке с ДЭАЕ-целлюлозой, элюция 0.01-0.5M NaCl в ТЭК-буфере	220	0.6	132	100	5.5	2200	55	2200	55	166	10	
Хроматография на колонке с оксипатитом, элюция 5 mM калий-фосфатным буфером (pH 6.8), 1M NaCl	I пик - 40 II пик - 54	0.3 0.14	1.2 7.6	43 110	0.05 0.3	1680 5940	4.2 15	1680 5940	4.2 15	1278 764	78 46	
Осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80% насыщение) и II пика и хроматография на сефадексе G-100 в ТЭК-буфере	40	0.1	4	160	0.16	6400	16	6400	16	1600	98	

между углеродом в 3'-положении и фосфатом, и кислой ДНКазой II, дающей разрывы между углеродом в 5'-положении и фосфатом. ДНКазы I атакуют нативную ДНК беспорядочно, разрыв межнуклеотидных связей в обеих нитях идет на значительном расстоянии, в связи с чем молекула ДНК, сохраняя двуниевую структуру, имеет одонитевые разрывы по всей длине молекулы (Thomas, 1956). Результаты исследования показали, что нативная ДНК устойчива к действию ДНКазы по сравнению с денатурированной ДНК. ДНК с различной степенью гидролиза относительно устойчива к действию фермента, как и нативная. После денатурации частично гидролизованной ДНК, одонитевые фрагменты ДНК становятся хорошим субстратом для ДНКазы. В случае действия ДНКазы II на нативную ДНК, происходит одновременный разрыв обеих нитей в симметричных участках, то есть имеет место простое укорочение двуниевых фрагментов ДНК (Bernardi, Sadron, 1964), и такая ДНК также устойчива к исследуемой ДНКазе.

1.2. Очистка Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы из эмбрионов морского ежа

Эмбрионы морского ежа суспензировали в 0.9 M растворе глюкозы. Цитолиз эмбрионов проводили в растворе 0.32 M растворе сахарозы, пропуская суспензию эмбрионов через иглу для подкожных инъекций. Осадок ядер суспензировали в 1.5 M растворе сахарозы и центрифугировали. Ядра лизировали, ДНП₀ экстрагировали 0.4M NaCl (фракция 0.4). Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимую ДНКазу из фракции 0.4 очищали ионообменной хроматографией на ДЭАЕ целлюлозе, хроматографией на оксипатите и сефадексе G-100.

Полученный белок имел удельную активность 1600 ед/мг белка (табл.2). Препаративные количества фермента, получали используя для элюции ступенчатый градиент, увеличивая объем элюции до 8-12 колоночных объемов. Полученный препарат фермента с удельной активностью 1200-1400 ед/мг белка давал одну полосу при электрофорезе в ПААГ-ДДС, имел молекулярную массу 42000 кДа, оптимум pH 7.5-7.8, активировался ионами Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} . Исследуемая ДНКазы гидролизует нативную и денатурированную ДНК, максимальная активность в отношении нативной ДНК проявляется при одновременном добавлении ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , на денатурированную ДНК в присутствии этих ионов фермент не действует. Полученные препараты фермента использовали для иммунизации животных.

2. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИСЫВОРОТОВ К ДНКАЗАМ

а) Для иммунизации кроликов использовали препараты Mn^{2+} -зависимой ДНКазы после ИЭФ с удельной активностью 1700-1900 ед/мг белка. Полученная антисыворотка содержала антитела к Mn^{2+} -зависимой ДНКазе, которые снижали активность фермента на 90%. Для доказательства моноспецифичности полученной антисыворотки и идентификации белков, обладающих Mn^{2+} -зависимой ДНКазной активностью, был использован метод иммуноблоттинга. Во всех исследуемых случаях обнаруживалась одна иммунореактивная полоса, совпадающая с полосой препарата фермента после ИЭФ (рис.1).

Кроме того, метод иммуноблоттинга позволил уточнить молекулярную массу ДНКазы, так как при иммуноблоттинге проводили электрофорез белков фракции 0.4, полученной непосредственно после выделения хроматина из ядер без многоэтапной очистки фермента, что уменьшает опасность протеолиза ДНКазы. Молекулярная масса Mn^{2+} -зависимой ДНКазы составила 41 кДа. Наличие одной иммунной реактивной полосы при иммуноблоттинге во фракциях 0.4, выделенных из ядер печени крыс различных возрастов, в норме и при регенерации, свидетельствует о том, что полученная антисыворотка моноспецифична, а ДНКазы идентичны.

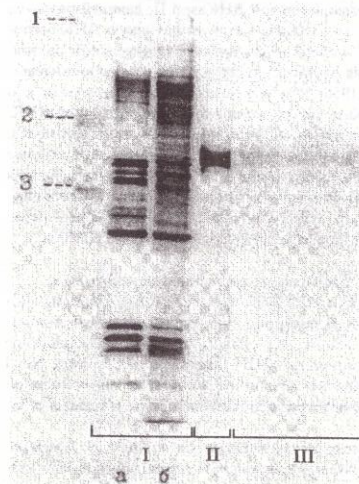


Рис.1. Результаты иммуноблоттинга белков, фракции 0,4 с антисывороткой к Мп-зависимой ДНКазе: I - электрофореграмма белков фракции 0,4 в 15%-ном ПААГ с 0,1%-ным DS-Na: а - ДНП_{0,4} (регенерирующая печень), б - ДНП_{0,4} (норма); II - Мп-зависимая ДНКазы после ИЭФ; III - перенос белков на фильтр и связывание с антителами к Мп-зависимой ДНКазе (препаративный метод выделения). Слева маркеры: 1 - бычий сывороточный альбумин, 2 - яичный альбумин, 3 - карбоангидраза.

б). В результате иммунизации кроликов препаратами Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы эмбрионов морского ежа с удельной активностью 1200-1400 ед/мг белка, антисыворотки ингибировали ДНКазу на 85-96 %. Иммуноблоттинг белков фракции 0,4 из хроматина ядер эмбрионов морского ежа с полученными сыворотками показал, что сыворотка взаимодействует только с одним из компонентов, молекулярная масса которого равна 42 кДа. Наличие одной иммунной реактивной полосы во фракции 0,4 и очищенной фракции Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы свидетельствует о моноспецифичности антисыворотки и об отсутствии субъединичной природы фермента.

в). Препаративные количества специфических антител, получали из иммунных сывороток ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе. Метод позволяет избавиться от природных антител (Ермекова и др., 1981) и характеризуется наиболее полным выходом антител с высокой степенью очистки (IgG), по сравнению с такими традиционными применяемыми приемами, как солевая преципитация, гelfiltrация на сефадексе G-75, спиртовая преципитация, очистка полистиленгликолем и аффинная хроматография (Phillips et al., 1984).

Полученные антитела мы использовали при синтезе конъюгатов с электронно-плотными маркерами, которые необходимы при электронном иммуногистохимическом исследовании ДНКаз.

3. ИММУННОЕ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДНКаз

а). **Определение локализации Мп²⁺-зависимой ДНКазы.** При изучении распределения Мп²⁺-зависимой ДНКазы на полутонких замороженных срезах печени методом

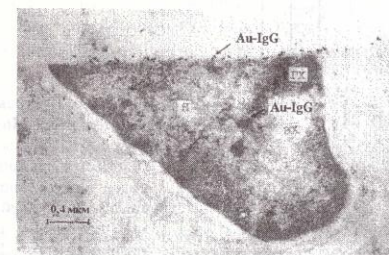
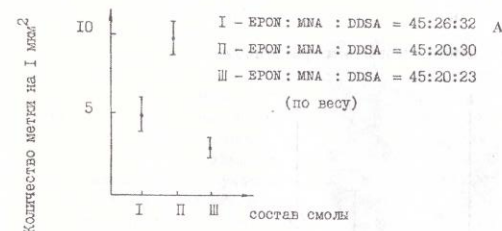


Рис.2. Зависимость количества связанного конъюгата (Au-IgG) и проникновения конъюгата внутрь эпителиального среза от состава заливочной среды. А - состав заливочной среды, Б - поперечный срез гепатоцита (увеличение-29000х).

флуоресцирующих антител, проведенных как с антисывороткой, так и с очищенной фракцией IgG, нами было показано, что флуоресценция наблюдается в ядрах гепатоцитов. Свечение в области цитоплазмы и межклеточном пространстве не обнаружено.

Для иммуногистохимического исследования были оптимизированы условия подготовки тканей для выявления ДНКазы в клетках на электронно-микроскопическом уровне. В частности, подобраны условия фиксации, обезживания, пропитки и заливки тканей в эпоксидную смолу (ЭПОН) и показано, что дополнительная фиксация тканей осмием и пропитка смолы при помощи окиси пропилена достаточно сильно изменяет антигенные свойства ферментов. Поэтому для фиксации мы использовали 2,5%-ный раствор глутарового альдегида, обезживание вели спиртами, ткани пропитывали смесью ЭПОНа с ацетоном и заливали в ЭПОН. Эпоновые срезы печени крыс и эмбрионов морского ежа обрабатывали специфическими конъюгатами антител с электронно-плотными метками. Для снятия неспецифической адсорбции антител, срезы тканей обрабатывали 5 %-ным раствором БСА. При исследовании локализации ДНКаз с помощью полученных конъюгатов, установлено, что важное значение имеет плотность заливочной среды, от которой зависит проникновение конъюгата внутрь среза (рис.2).

При электронном иммуногистохимическом исследовании эпоновых срезов было отмечено, что Мп²⁺-зависимая ДНКазы локализуется в ядрах гепатоцитов. При сравнительном изучении ультратонких срезов нормальной печени крыс, лимфатического узла, тимуса, селезенки и коры мозжечка после иммунного окрашивания конъюгатом: антитела к Мп²⁺-зависимой ДНКазе-коллоидное золото, обнаружено, что в ядрах клеток этих органов локализуется иммунологически родственный белок (рис.3).

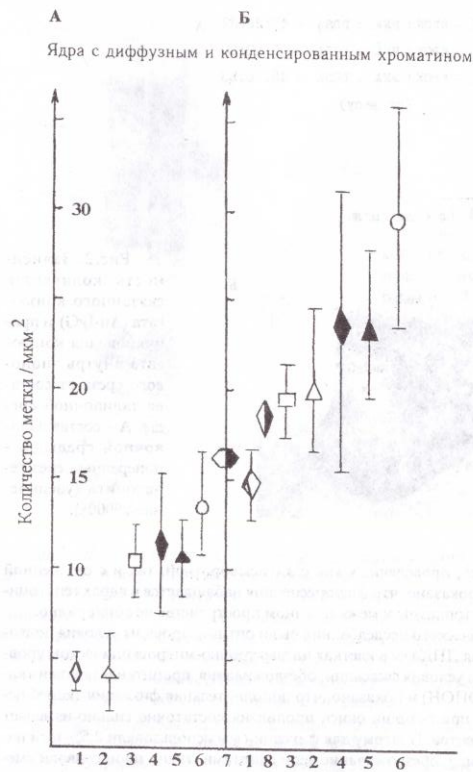
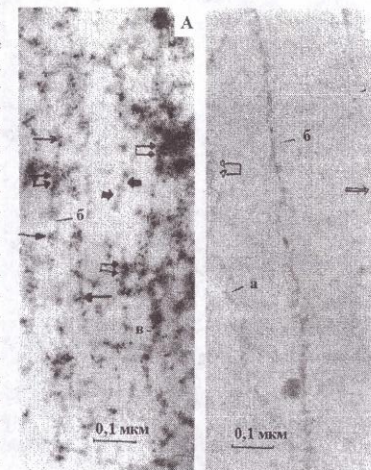


Рис.3. Диаграмма распределения Мп-зависимой ДНКазы по количеству связанной метки в ядрах клеток различных тканей: 1-эндотелиальные, секреторные клетки, 2-гепатоцит, 3-тимус, 4-лимфоцит, 5-макрофаг, 6-селезенка, 7-глиальные клетки коры мозжечка, 8-плазматическая клетка. Исследовались ядра с диффузным хроматином (А) и с конденсированным хроматином (Б).

При изучении интерфазных ядер печени было обнаружено, что в ядрах с диффузным хроматином ДНКазы по хроматину распределены довольно равномерно. В ядрах с гетерогенной организацией хроматина маркеры (ДНКазы) концентрировались, в основном, в хроматиновых глыбках и активном примембранном хроматине. Причем, с хроматином таких ядер связывалось в несколько раз больше конъюгата, чем в ядрах с диффузным хроматином.

При исследовании лимфоцитов, плазматических клеток, эндотелиальных и секреторных клеток максимальное количество ДНКазы было выявлено в лимфоцитах. Периферическая зона и хроматиновые глыбки в ядрах этих клеток также содержали большее количество ДНКазы.

Рис. 4. Локализация Мп-зависимой ДНКазы в изолированных структурах хроматина интерфазных ядер гепатоцитов в опыте (А) и контроле (Б): а-хроматиновые фибриллы типа "открытый заглаз" (12 нм), б-хроматиновые фибриллы типа "бусины-на-нитке" (12,5 нм), в-нуклеофилamentы (7 нм). Светлые стрелки-нуклеосомы (10-13 нм), стрелки - нуклеосомы, покрытые ферритином (25-35 нм), двойные стрелки со светлыми головками - ассоциаты нуклеосом (30-60 нм), двойные стрелки-ассоциаты нуклеосом, покрытые ферритином (40-80 нм), светлые головки стрелок-нуклеофилamentы (5-7 нм), темные головки стрелок-нуклеофилamentы, покрытые ферритином (9-12,5 нм), толстые стрелки-ферритин, связанный с линкерной ДНК. Опыт (А) - хроматин обработан специфическим конъюгатом (IgG+Fe); контроль (Б) - хроматин обработан немечеными специфическими антителами, затем конъюгатом. Увеличение 90000х.



б). Локализация Ca^{2+} Mg^{2+} -зависимой ДНКазы. При изучении локализации ДНКазы морского ежа на первых стадиях развития эмбрионов было отмечено, что с увеличением времени после оплодотворения увеличивается количество ДНКазы, особенно, в области ядра, то есть в процессе развития эмбриона идет синтез ДНК. При изучении распределения ДНКазы на стадии средней бластулы было показано, что фермент локализуется, как в ядре, так в цитоплазме, что подтверждается биохимическими исследованиями. В ядрах эмбрионов максимальное количество фермента локализуется в конденсированных участках хроматина и в области примембранного хроматина.

в). Локализация Мп²⁺-зависимой ДНКазы в структурах хроматина. Динамическая природа хроматина придает особое значение методам, при помощи которых можно получить достоверную информацию о нативной *in situ* организации отдельных хромосомальных компонентах на разных уровнях организации хроматина. Поэтому, для изучения локализации Мп²⁺-зависимой ДНКазы в структурах хроматина, мы использовали метод Миллера в модификации Лабхарта и Коллера, который позволяет визуализировать активный хроматин интерфазных ядер.

Опираясь на литературные данные о том, что обработка нуклеосом (10-12 нм) антителами увеличивает их диаметр на 300 % (Bustin, 1979), мы установили, что полученные нами структуры хроматина, диаметр которых после обработки конъюгатом - (IgG-Fe), составил 25-30 нм представляют собой нуклеосомную нить, а глобулы - нуклеосомы. ДНКазы распределяется по всей длине хроматиновых фибрилл интерфазных ядер и локализуется как в нуклеосомах, так и в линкерной ДНК (рис. 4). Анализируя количество

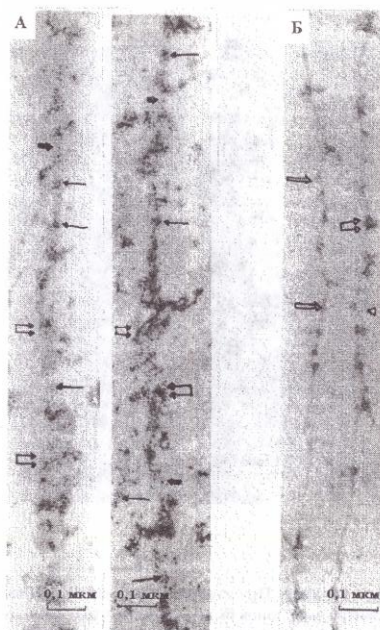


Рис.5. Локализация Mn^{2+} -зависимой ДНКазы в изолированных структурах хроматина пролиферирующих ядер гепатоцитов в опыте (А) и контроле (Б). Светлые стрелки-нуклеосомы (10-13 нм), стрелки-нуклеосомы, покрытые ферритином (25-35 нм), двойные стрелки со светлыми головками - ассоциаты нуклеосом (30-60 нм), двойные стрелки-ассоциаты нуклеосом, покрытые ферритином (40-80 нм), светлые головки стрелок-нуклеофиламенты (7нм), темные головки стрелок-нуклеофиламенты, покрытые ферритином (9-12,5 нм), толстые стрелки-ферритин, связанный с линкерной ДНК. Опыт (А) - хроматин обработан специфическим конъюгатом (IgG+Fe); контроль (Б) - хроматин обработан немечеными специфическими антителами, затем конъюгатом. Увеличение 100000х.

связанного конъюгата с нуклеосомами, отметили, что ДНКазы по нуклеосомам распределяется неравномерно. На препаратах хроматина, полученных из ядер регенерирующей печени наблюдается более равномерное распределение конъюгата и с нуклеосомными фибриллами связывается большее количество конъюгата (рис. 5).

Таким образом, показано, что Mn^{2+} -зависимая ДНКазы обнаружена по всей длине нуклеосомной нити: нуклеосомах и линкерной ДНК. Основное количество ДНКазы локализуется в нуклеосомах, которые различаются по содержанию фермента, что может отражать физиологическое состояние хроматина.

3.1. Взаимодействие ДНКаз с ДНК

Нами разработан метод иммунного электронно-микроскопического анализа ДНК-белковых взаимодействий *in vitro*, важным отличием которого является формирование продуктов реакции в буфере, который используется для биохимического анализа.

Специфическая реакция связывания позволяет не только стабилизировать комплекс, но и дает информацию относительно родства специфических участков комплекса. Такой комплекс переносится на электронно-микроскопическую сетку и обрабатывается антителами к ДНКазе, мечеными коллоидным золотом. В результате такой реакции при

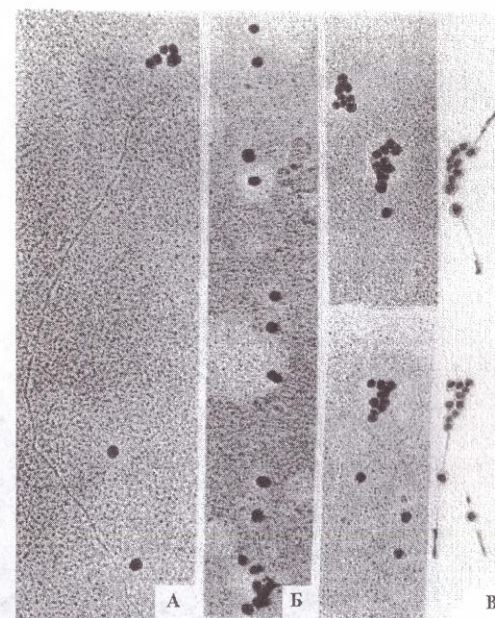


Рис.6. Взаимодействие Mn^{2+} -зависимой ДНКазы с ДНК. А - нативная ДНК (120000х), Б - денатурированная ДНК (120000х), В - фрагменты частично денатурированной ДНК (75000х).

определении характера взаимодействия Mn^{2+} -зависимой ДНКазы с нативной и денатурированной ДНК, показано, что при обработке рестриков нативной ДНК ферментом, последний не сорбируется на двуспиральные участки ДНК, а взаимодействие наблюдается только на конце рестрикта. В случае действия на денатурированную ДНК фермент достаточно равномерно распределяется по всей длине денатурированной молекулы, то есть фермент гидролизует одноцепочечные участки независимо от их расположения и является эндонуклеазой (рис.6), что подтверждает наши данные, полученные биохимическими методами.

При изучении взаимодействия Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы эмбрионов морского ежа с ДНК в условиях начальной скорости гидролиза, установлено, что сразу после добавления фермента на препаратах с нативной ДНК по всей молекуле располагаются частицы золота, то есть места локализации ДНКазы (рис.7).

Через 5 мин молекулы ДНК становятся короче, фермент обнаруживается и на концах, и в середине фрагментов (рис.8). Через 10 мин фрагменты ДНК, как правило, несут на себе не более одной частицы золота на конце фрагмента ДНК (рис.9). Таким образом, видно, что при гидролизе высокополимерной ДНК выявляется динамика гидролиза субстрата, которая позволяет ставить вопрос о наличии в молекуле ДНК определенных

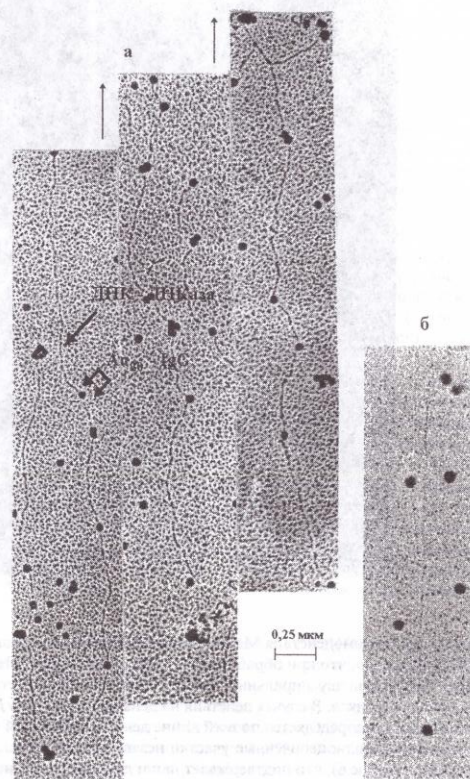


Рис.7. Взаимодействие Са,Мg-зависимой ДНКазы с нативной ДНК. Стрелки - продолжение одной молекулы ДНК. а - опыт; ферментный комплекс ДНК-ДНКазы (стрелка), обработанный конъюгатом Au_{15} -IgG (двойная стрелка) к Са,Мg-зависимой ДНКазе, б - контроль; ферментный комплекс ДНК-ДНКазы, обработанный конъюгатом коллоидного золота с неиммунными антителами.

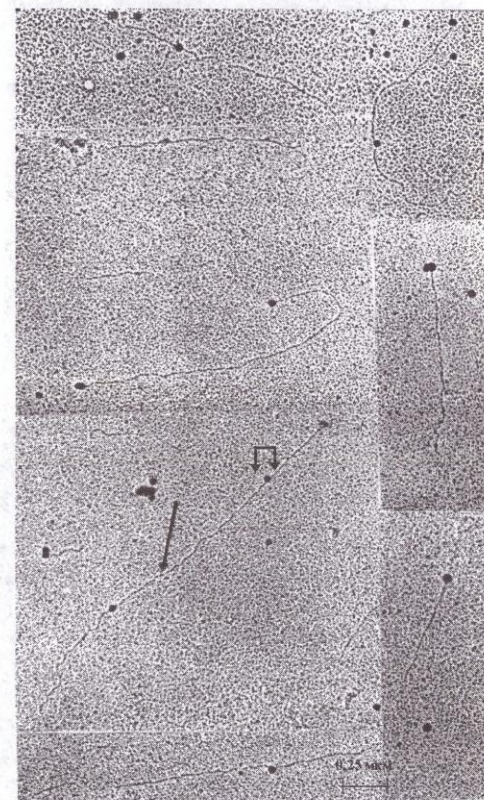


Рис.8. Взаимодействие Са,Мg-зависимой ДНКазы с нативной ДНК: ДНК после 5 мин гидролиза. Ферментный комплекс ДНК-ДНКазы (стрелка), обработан конъюгатом Au_{15} -IgG (двойная стрелка) к Са,Мg-зависимой ДНКазе.

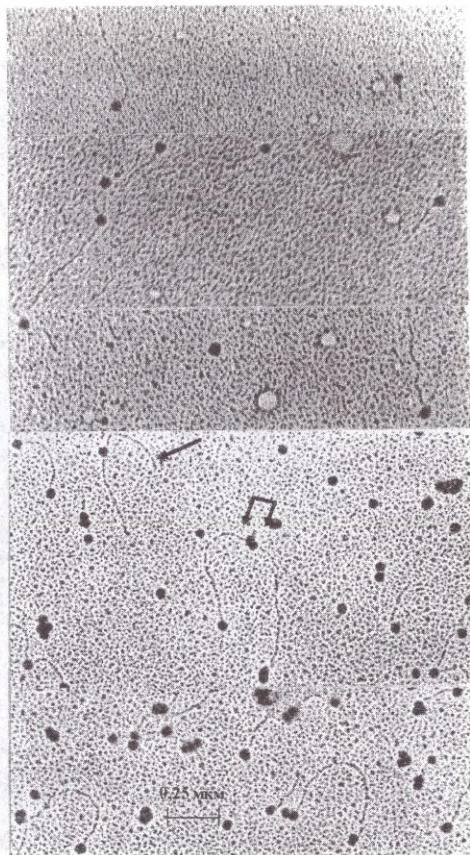


Рис.9. Взаимодействие Са,Мg-зависимой ДНКазы с нативной ДНК: ДНК после 10 мин гидролиза. Ферментный комплекс ДНК-ДНКазы (стрелка), обработан конъюгатом Au_{15} -IgG (двойная стрелка) к Са,Мg-зависимой ДНКазе.

нуклеотидных последовательностей, которые узнаются и расщепляются ДНКазой ядер морского ежа.

4. ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

4.1. Свойства ДНК-связывающих белков ядер печени крыс

Электронно-микроскопические исследования показали, что *in situ* Mn^{2+} -зависимая ДНКазы локализуется по всей длине нативного хроматина, в то время как, *in vitro* ДНКазы способна взаимодействовать только с денатурированной ДНК. Поэтому мы сделали предположение, что в нативном хроматине есть белки, способные образовывать комплексы с ДНК-азами, отвечающими за иммобилизацию ДНКаз в структурах нативного хроматина и за регуляцию их активности. Для ответа на эти вопросы мы поставили задачу выделить такие белки.

а). ДНК-связывающие белки ядер печени крыс выделяли из фракции 0,4 белков хроматина, содержащей активность Mn^{2+} -зависимой ДНКазы.

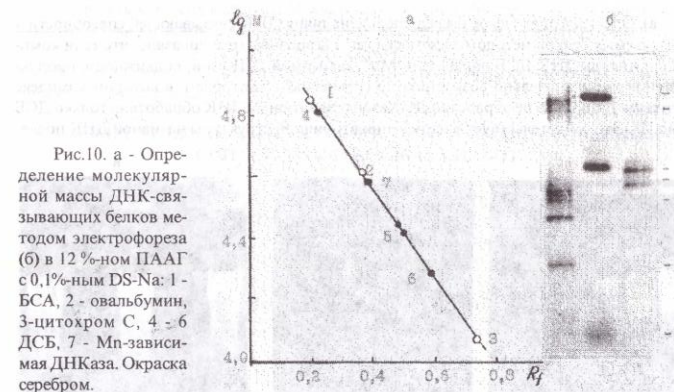


Рис.10. а - Определение молекулярной массы ДНК-связывающих белков методом электрофореза (б) в 12 %-ном ПААГ с 0,1%-ным DS-Na: 1 - БСА, 2 - овальбумин, 3-цитохром С, 4 - 6 ДСБ, 7 - Mn^{2+} -зависимая ДНКазы. Окраска серебром.

Фракцию 0,4 после диализа пропускали через последовательно соединенные колонки с аффинными сорбентами: денатурированная ДНК-целлюлоза, нативная ДНК-целлюлоза. Элюцию белков с нативной ДНК-целлюлозы проводили градиентом NaCl. Белки, обладающие ДНК-связывающей способностью (ДСБ), элюировались при ионной силе 280-380 мМ. Молекулярную массу белков определяли гель-хроматографией на сефадексе G-75 и электрофорезом в денатурирующих условиях. В первом случае ДСБ элюировались в виде двух пиков с молекулярной массой в пиковых фракциях 61,8 и 22,8 кДа, во втором случае было выявлено три группы белковых полос с молекулярной массой 20, 28, 30, 63-65 кДа (рис.10). Полученные ДСБ не давали перекрестной реакции с антителами к Mn^{2+} -зависимой ДНКазе при ИФА.

б). Влияние ДНК связывающих белков хроматина ядер печени крыс на активность Mn^{2+} -зависимой ДНКазы. В качестве субстрата использовали денатурированную и нативную ДНК эритроцитов цыплят. На рис.11 видно, что при добавлении ДСБ ядер печени крыс в инкубационную пробу, содержащую денатурированную ДНК, гидролиз ДНК возрастал. На нативную ДНК Mn^{2+} -зависимая ДНКазы не действует (рис.11,3), однако гидролиз нативного субстрата происходит, если нативную ДНК, предварительно проинкубировать с фракцией ДСБ (рис. 11,4).

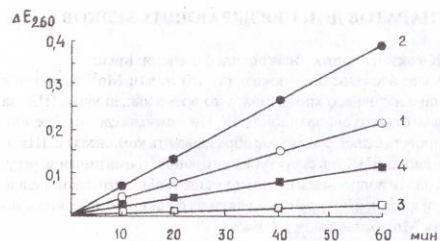


Рис.11. Сравнение влияния фракции ДНК-связывающих белков на активность Мп-зависимой ДНКазы при гидролизе денатурированной ДНК (1 - контроль, 2 - опыт) и нативной ДНК (3 - контроль, 4 - опыт).

в). Электрофоретическое исследование наличия ДНК-связывающей способности у исследуемых белков методом электрофореза в агарозном геле показало, что если комплекс нативная ДНК-ДСБ обработать Мп²⁺-зависимой ДНКазой, подвижность продуктов реакции значительно возрастала по сравнению с контролем, в котором комплекс нативная ДНК-ДСБ не обработан ДНКазой или нативная ДНК обработана только ДСБ (рис.12). Это свидетельствует о нарушении вторичной структуры нативной ДНК после

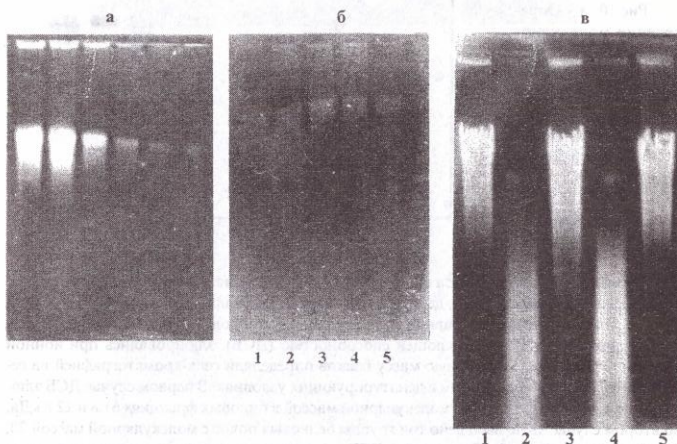


Рис.12. Изучение наличия ДНК-связывающей способности исследуемой фракции ДСБ печени крыс при гидролизе нативной ДНК Мп-зависимой ДНКазой. а - Определение минимальной концентрации ДНК; б - ДНК, обработанная ДСБ: 1 - контроль (нативная ДНК без ДСБ). Опыт - нативная ДНК+ДСБ без разведения (2) и в разведениях (3-5); в - Влияние ДСБ на активацию Мп-зависимой ДНКазы при гидролизе нативной ДНК: дорожка 1 - нативная ДНК, дорожка 3 - нативная ДНК+ДСБ без ДНКазы, дорожка 5 - нативная ДНК+ДНКазы без ДСБ (контроль); дорожки 2, 4 - нативная ДНК, обработанная ДСБ+ДНКазы (опыт). Электрофорез в 1%-ном агарозном геле, окраска этидиумбромидом.

обработки ее исследуемой фракцией ДСБ, поэтому Мп²⁺-зависимая ДНКазы приобретает способность гидролизовать нативную ДНК.

Таким образом, стимулирующее действие ДСБ ядер печени крыс обусловлено взаимодействием с ДНК, в результате чего повышается чувствительность ДНК к ДНКазам, то есть ДСБ могут выступать в качестве модуляторов действия ДНКаз хроматина.

4.2. Очистка ДНК-связывающего белка из ядер эмбрионов морского ежа

ДНК-связывающий белок из эмбрионов морского ежа выделяли на стадии средней бластулы. Эмбрионы гомогенизировали, белки осаждали 90 %-ным насыщением сульфата аммония. Осадок растворяли, обессоливали и наносили на колонку с ДЕАЕ-целлюлозой. Элюцию вели градиентом NaCl, белки элюируемые при ионной силе 0,1-0,15M NaCl собирали, концентрировали и подвергали гель-хроматографии на колонке с Тоуорепарг-65 (1% элюата к объему колонки). Элюцию проводили 0,1M NaCl в 10 mM трис буфере (pH 8,0). Наличие ДНК-связывающей активности определяли по методу описанному Галкиным В.В (1988). Полученный белок был использован для изучения роли ДСБ в синтезе ДНК и о возможном совместном действии ДНКазы и ДСБ при синтезе ДНК в ядрах эмбрионов морского ежа.

5. ИЗМЕНЕНИЕ ДНКазной АКТИВНОСТИ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ СИНТЕЗЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Изучив распределение Мп²⁺-зависимой ДНКазы в интерфазных ядрах, мы поставили задачу исследовать распределение ДНКазы в пролиферирующих тканях и изучить изменение активности фермента в процессе синтеза нуклеиновых кислот. Индукцию синтеза ДНК получали в результате частичной гепатэктомии.

Таблица 3

Изменение содержания ДНКазы в гепатоцитах при регенерации

Количество маркеров в ядре на мкм ²	Время после частичной гепатэктомии, ч			
	0 (норма)	6	19	23
Опыт	5,6±1,1	11,7±2,7	23,0±4,5	18,1±3,7
Контроль на специфичность связывания конъюгата	3,0±1,5	3,0±1,2	2,1±1,8	2,9±2,4

При электронном иммуно-гистохимическом анализе срезов регенерирующей печени крыс было отмечено, что в ядрах происходит изменение содержания ДНКазы. Количественная оценка связывания конъюгата с хроматином ядер показала, что максимальное количество ДНКазы выявляется к 19 ч и несколько снижается к 23 ч после частичной гепатэктомии (табл.3), причем в течение всего периода регенерации ДНКазная активность хроматина была ниже, чем в препаратах, выделенных из ядер покоящейся печени.

6. УЧАСТИЕ ДНКаз В СИНТЕЗЕ ДНК in vitro

В качестве модельной системы для изучения влияния ДНКаз на синтез ДНК были использованы ядра, изолированные из нормальной и регенерирующей печени крыс и эмбрионов морского ежа. В результате проведенных нами исследований было показано, что изолированные ядра печени крыс синтезируют ДНК in vitro. Интенсивность синтеза ДНК в ядрах из регенерирующей печени почти в 3 раза выше, чем в ядрах из нормальной печени, что свидетельствует о продолжении синтеза ДНК, начатого в ядрах регенерирующей печени in vivo.

Таблица 4
Включение *in vitro* [³H] dCTP в ДНК ядер эмбрионов морского ежа *St. intermedius*

Условия опыта	Включение [³ H]dCTP, имп/мин	Синтез, %
Полная система	20600	100
Система ДНК + ATP, - dNTP	16480	80
- ATP, + dNTP	17510	85
- ATP, - dNTP	2000	9
+ бромистый этидий, 10 мкг/мл	3090	15
+ актиномицин D, 40 мкг/мл	4326	21
+ ага CTP, 1 мМ	6180	30

Таблица 5
Включение [³H] TTP в ДНК изолированных ядер печени крыс в % к контролю (полная реакционная смесь)

Условия опыта	Включение [³ H] TTP (синтез в %)	Регенерирующая печень	Нормальная печень
Полная система	100		100
Система ДНК: — MnCl ₂	6		10
— 20 мМ KCl	80		80
— 80 мМ KCl	60		60
— ATP, + dNTP	8		12
— dATP	60		70
— dCTP, — dGTP	42		45
— dATP, — dCTP, — dGTP	15		12

Особенностью синтеза ДНК в ядрах эмбрионов морского ежа на стадии средней бластулы, оказалась слабая зависимость синтеза ДНК от добавляемых экзогенных dNTP (табл. 4), в то время как, ядерные системы синтеза ДНК клеток печени полностью зависят от присутствия всех четырех dNTP (табл. 5). Удаление трех экзогенных нуклеотидов из ядерной системы синтеза ДНК эмбрионов морского ежа снижало включение метки лишь на 20% (табл. 4).

Для характеристики типа ДНК-полимеразы, которая осуществляла синтез ДНК в выделенных ядрах, мы использовали ингибиторы ДНК-полимеразы α - фермента репликативного комплекса (Елисеева, Шарова, 1993; Елисеева, 1994): N-этилмалеимид, цитозин-Д-арабинофуранозид-5 трифосфат и афидиколин.

В ядрах эмбрионов морского ежа при концентрации N-этилмалеимида (1,2 мМ) происходило блокирование синтеза ДНК на 84%, как и в случае с ядрами, выделенными из клеток печени крыс (Zonchedolu et al., 1983; Akidoshi, 1984), а также в системе с очищенной ДНК-полимеразой α (Weissbach, 1981; Hubscher, Ottiger, 1984; Khan, Brown, 1985). Добавление N-этилмалеимида (0,5 мМ) в систему для изучения синтеза ДНК в ядрах печени крыс в данной работе также вело к подавлению синтеза ДНК. Согласно литературным данным N-этилмалеимид в концентрации 1 мМ, не ингибирует активность ДНК полимеразы β и не влияет на репаративный синтез ДНК ядер печени крыс (Zonchedolu et al., 1983) и в клетках миеломы мышей (Bessera, Wilson, 1984).

Аналогичные результаты были получены нами и в случае внесения ага CTP, аналога субстрата ДНК-полимеразы α , который блокирует элонгацию ДНК, и афидиколина, который блокирует S-фазу. Лонгуари с соавторами (Longiaru et al., 1979) показали, что

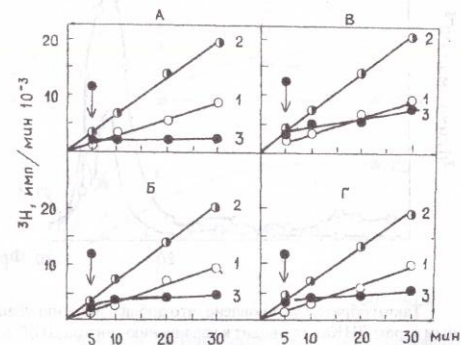
афидиколлин из гриба *Cephalosporium aphidicola* подавляет рост вируса герпеса, осповакцины, клеток HeLa и клеток из яичника китайского хомячка, игибируя синтез ДНК. Авторы отметили, что высокоочищенная ДНК полимеразы α из клеток HeLa ингибируется афидиколином, а ДНК полимеразы β и γ устойчивы к действию афидиколина. Синтез ДНК аденовируса ингибируется афидиколином как в интактных клетках, так и в ядерных экстрактах, в которых происходит элонгация ДНК. Этот синтез ингибируется в той же степени, что и очищенная ДНК полимеразы α . Результаты изучения ингибирующего действия афидиколина на ДНК полимеразы вирусов и человека представлены в работе (Pedrali-Noy, Spadari, 1979). Авторы показали, что афидиколлин ингибирует очищенную ДНК полимеразу α из клеток HeLa. ДНК полимеразы вируса герпеса и осповакцины, кодирующие репликативную функцию, несколько отличаются от ДНК полимеразы α , но также ингибируются афидиколином. При этом авторы отметили, что ДНК полимеразы β и γ полностью устойчивы к действию афидиколина *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, добавление афидиколина приводит к подавлению репликативного, но не репаративного синтеза ДНК *in vivo* (Pedrali-Noy, Spadari, 1979; Pedrali-Noy et al., 1980).

Поэтому можно предположить, что выделенные ядра эмбрионов морского ежа и ядра печени крыс сохраняли способность вести репликативный синтез ДНК.

Далее мы приступили к изучению участия Mn^{2+} -зависимой и Ca^{2+}, Mg^{2+} -зависимой ДНКаз в синтезе ДНК и установили, что количество фермента, которое стимулирует синтез ДНК в ядрах, составляет 0,4 - 3,0 ед на пробу. На рис. 13 показано, что при добавлении 1 ед Mn^{2+} -зависимой ДНКазы на пробу происходит увеличение синтеза ДНК в 2 раза.

Рис. 13. Синтез ДНК

в ядрах нормальной печени крыс стимулированный добавлением эндогенной Mn -зависимой ДНКазы в присутствии различных ингибиторов ДНК полимеразы α . 1 - контроль, 2 - внесено 1 ед ДНКазы, 3 - внесено ингибиторов: А - 0,5 мМ N-ЭМ, Б - 0,3 мМ ага CTP, В - 2 мкг/мл афидиколина, Г - 15 мкг/мл актиномицина D. Стрелки - внесение ингибитора.



Аналогичные результаты получены при добавлении к ядрам эмбрионов морского ежа Ca^{2+}, Mg^{2+} -зависимой ДНКазы. Увеличение концентрации фермента до 20 ед приводит к ингибированию синтеза ДНК в ядрах. Добавление ингибиторов ДНК полимеразы вело к подавлению индуцированного синтеза ДНК как в ядрах печени крыс (рис. 13), так и в ядрах из эмбрионов морского ежа (рис. 14).

Чтобы определить, какой синтез стимулируется ДНКазами в ядрах-репаративный или репликативный, был проведен анализ новосинтезированной ДНК методом ультрацентрифугирования в щелочном градиенте сахарозы. Результаты показали, что при добавлении в инкубационную среду ДНКазы уже через 5 мин инкубации наблюдается уве-

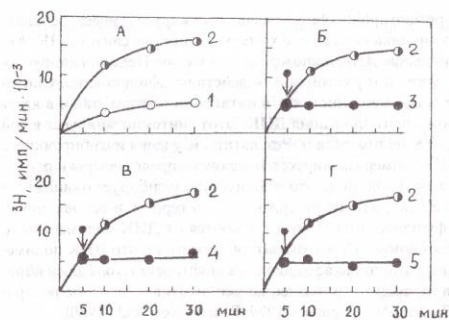


Рис.14. Влияние ингибиторов ДНК полимеразы α на синтез ДНК в изолированных ядрах эмбрионов морского ежа, обработанных Са, Mg-зависимой ДНКазой (А): 1 - контроль (без ДНКазы), 2 - ядра+1,5 ед ДНКазы. Через 5 мин инкубации системы ядра+ДНКазы внесены ингибиторы: Б - 3 мМ афидиколлина (3), В - 1,2 мМ N-ЭМ (4), Г - 1,0 мМ араСТР (5). Стрелки - внесение ингибитора.

личение включения метки в короткие фрагменты ДНК, порядка 4S (рис.15). Включение метки в короткие фрагменты ДНК было АТФ-зависимым.

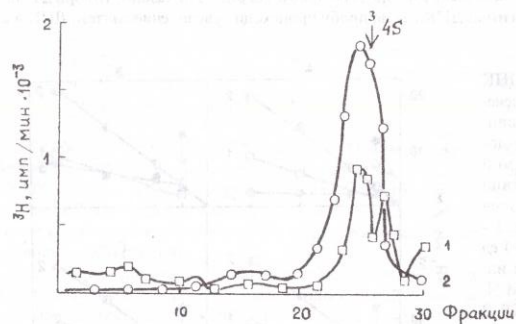


Рис.15. Седиментация ядер, обработанных Са, Mg-зависимой ДНКазой (2,4 ед). 1-контроль (распределение метки в градиенте после инкубации ядер эмбрионов морского ежа с $[^3H]CTP$ в течение 30 мин), 2-ядра+Са, Mg-зависимая ДНКазы, 3 - положение маркера.

Таким образом установлено, что добавление в инкубационную среду к изолированным ядрам ДНКаз, приводит к увеличению синтеза ДНК, за который ответственна ДНК полимеразы α . Анализ седиментационных характеристик показал, что образуются короткие фрагменты с константой седиментации, порядка, 4-5 S, которые соотносятся по своим размерам с фрагментами "Оказаки".

7. ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ К ДНКАЗАМ НА СИНТЕЗ ДНК В ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДРАХ ПЕЧЕНИ КРЫС И ЭМБРИОНАХ МОРСКОГО ЕЖА

Важные выводы о роли тех или иных белков в клеточном метаболизме ДНК можно получить путем их исключения из мультиферментной системы с помощью специфических антител. Данный прием был использован нами при изучении роли ДНКаз в синтезе

ДНК. Результаты исследования показали, что антитела к Mn^{2+} -зависимой ДНКазе и Ca^{2+}, Mg^{2+} -зависимой ДНКазе подавляют синтез ДНК в ядрах. Остановка синтеза ДНК наблюдалась при одновременном добавлении антител и ДНКазы, например, к ядрам регенерирующей печени крыс (рис.16), так и спустя некоторое время после начала реакции (рис.17).

Рис.16 Влияние антител к Mn -зависимой ДНКазе на синтез ДНК ядрами регенерирующей печени. 1- ядра регенерирующей печени (контроль без антител), 2 - добавление антител (100 мкг/мл).

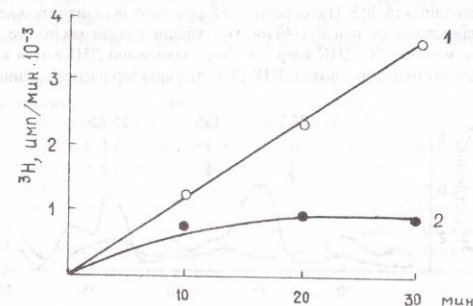
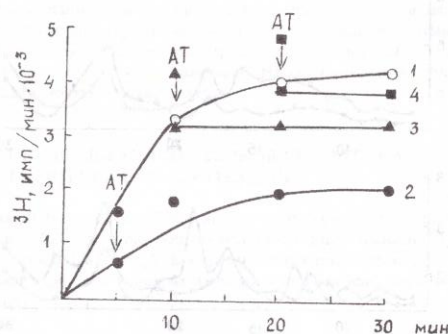


Рис.17. Влияние антител (АТ) к Са, Mg-зависимой ДНКазе на синтез ДНК ядрами эмбрионов морского ежа в зависимости от времени добавления в инкубационную среду. 1 - контроль (ядра + Са, Mg-зависимая ДНКазы), 2 - АТ добавлены в начале инкубации, 3 - АТ добавлены через 10 мин инкубации, 4 - АТ добавлены через 20 мин инкубации.



В контроле глобулины, выделенные из неиммунной сыворотки или неспецифические иммуноглобулины (например, к БСА), не оказывали влияния на синтез ДНК в ядрах, то есть ингибирующее действие антител к ДНКазам, связано со специфическим подавлением активности ДНКаз хроматина.

8. ВЛИЯНИЕ Са, Mg-ЗАВИСИМОЙ ДНКАЗЫ НА ТОТАЛЬНО МЕЧЕННЫЕ ^{14}C -ДНК ЯДРА

Чтобы выяснить, связано ли образование коротких фрагментов ДНК с индукцией синтеза ДНК, или появление коротких фрагментов ДНК является результатом расщепления эндогенными ДНКазами ранее синтезируемой ДНК, был проведен седиментаци-

онный анализ totally меченых ^{14}C -ДНК ядер эмбрионов морского ежа, после инкубации последних в условиях, используемых для синтеза ДНК *in vitro*. Как видно из рис. 18 после центрифугирования в щелочном градиенте на седиментограмме наблюдается дискретное распределение нуклеотидного материала по всему градиенту сахарозы. В ходе инкубации высокомолекулярные фрагменты постепенно исчезают и основным продуктом действия ДНКаз является гетерогенная смесь фрагментов ДНК с константой седиментации 16-30 S. Накопление 4-5 S фрагментов незначительное и составляет около 20%, даже после длительной (40 мин) инкубации в условиях *in vitro*. При добавлении к totally меченой ^{14}C -ДНК ядер Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы, в количествах используемых для стимуляции синтеза ДНК (4-8 ед), характер распределения меченой ДНК в щелоч-

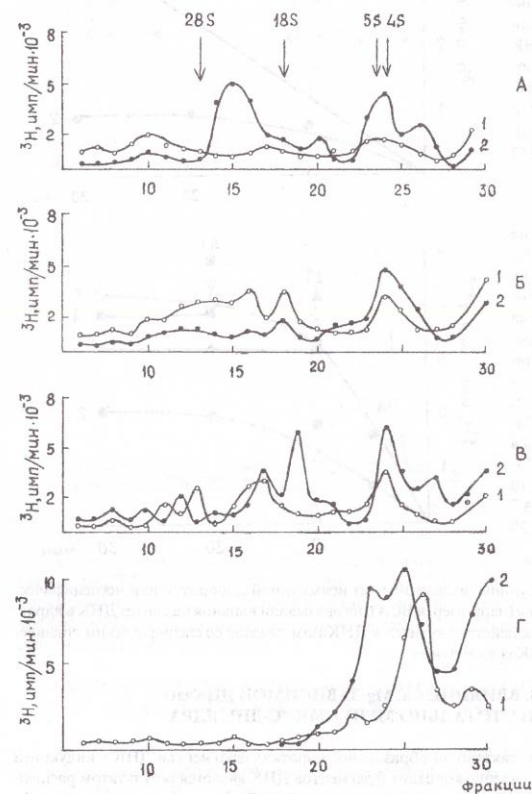


Рис. 18. Седиментационный анализ totally меченой ^{14}C -ДНК ядер эмбрионов морского ежа в щелочном градиенте сахарозы. А - контроль, седиментация без ДНКазы; Б - внесена Ca , Mg -зависимая ДНКаз (4 ед); В - внесена ДНКаз I (2 ед); Г - внесена ДНКаз I (30 ед). Время инкубации: 1 - 5 мин; 2 - 40 мин.

ном градиенте после различного времени инкубации близок к контрольному. Это свидетельствует, что в результате действия как эндогенной, так и экзогенной Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы не образуется существенного количества фрагментов ДНК, даже при длительной инкубации. При действии на меченые ^{14}C -ДНК ядра ДНКазой I также образуются гетерогенная смесь фрагментов ДНК, при этом доля низкомолекулярных фрагментов возрастает незначительно. Только после исчерпывающего гидролиза ядер ДНКазой I (30 ед) вся ДНК представлена низкомолекулярными фрагментами, но при добавлении таких количеств ДНКазы синтез ДНК в ядрах останавливается, практически, моментально.

Исходя из полученных данных по действию внутриядерных ДНКаз на totally меченые по ^{14}C -ДНК ядра можно сделать заключение, что наблюдаемое накопление коротких фрагментов ДНК в ядрах после внесения Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы и ДНКазы I в первые минуты (10-20 мин) синтеза ДНК (рисунок не приводится), обусловлено стимуляцией синтеза ДНК, а не результатом распада новосинтезируемой ДНК.

Наблюдаемые нами различия в степени стимуляции и характера синтезируемой ДНК при обработке ядер эмбрионов морского ежа Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазой и ДНКазой I, по-видимому, определяются разной специфичностью этих ферментов. Как показали наши данные, ДНКаз I стимулирует синтез ДНК только после определенного лаг-периода по сравнению с Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазой, что, вероятно, определяется необходимостью накопления достаточного количества разрывов доступных для связывания ядерных ДНК-синтезирующих ферментов.

На основании полученных данных мы сделали предположение, что инициация репликации ДНК зависит от структуры origin и наличия в клетке свободной активности ДНКазы. В этом случае активность ДНКаз должна строго контролироваться.

И действительно, показано, что Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимая ДНКаз морского ежа обладает слабой внутриядерной активностью (Nakamura et al., 1984).

9. ВЛИЯНИЕ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС НА СИНТЕЗ ДНК

Для изучения влияния ДСБ на синтез ДНК в ядрах печени крыс, мы определили оптимальную концентрацию ДСБ, стимулирующую активность Mg -зависимой ДНКазы *in vitro*, и показали, что при добавлении ДСБ к ядрам стимуляция синтеза ДНК наблюдается как в покоящихся ядрах, так и в ядрах регенерирующей печени почти на 90-50%, соответственно (табл. 8).

Таблица 6

Влияние ДСБ хроматина печени крыс на синтез ДНК в ядрах

Условия реакции	Включение ^3H dTP, имп/мин	Синтез ДНК, %
Покоящиеся ядра (ПЯ)	1121	100
ПЯ + ДСБ (50 мкг/мл)	2078	185
Ядра регенерирующей печени (ЯРП)	3323	100
ЯРП + ДСБ	5056	152
ЯРП + АТ к Ca , Mg -зависимой ДНКазе (100 мкг/мл) + ДСБ	1145	34

10. ВЛИЯНИЕ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ЭМБРИОНОВ МОРСКОГО ЕЖА НА СИНТЕЗ ДНК

При проведении эксперимента по влиянию ДСБ из эмбрионов морского ежа на синтез ДНК в работе использовали различные концентрации ДСБ. Как видно из рис.19, внесение в инкубационную пробу ДСБ от 6 мкг/мл (рис.19,А) до 40 мкг/мл (рис.19,Б) стимулирует линейное включение метки в ДНК ядер изолированных из эмбрионов морского ежа в течение 30 мин на 40-180 %, соответственно. При повышении концентрации ДСБ до 60 мкг/мл, линейное включение наблюдалось в течение первых 20 мин, и далее резко снижалось. При одновременном добавлении ДСБ и Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы (4 ед) наблюдалось повышенное включение метки: в 4 раза больше по сравнению с контролем (без ДНКазы и без ДСБ) и в 2 раза больше по сравнению с внесением только ДСБ. Предполагая, что повышение синтеза ДНК в ядрах эмбриона морского ежа при внесении только ДСБ в инкубационную пробу связано с присутствием ДНКазы в препаратах ДСБ, мы прогрели ДСБ при 56°C в течение 30 мин. Прогретые препараты ДСБ также стимулировали линейное включение метки в ядра.

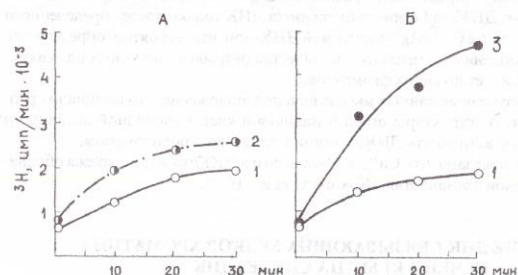


Рис.19. Зависимость включения $[^3\text{H}]$ dCTP в ядра от количества ДСБ морского ежа. А - контроль (1), ядра+ДСБ 6 мкг (2); Б - контроль (1), ядра+36 мкг ДСБ (3).

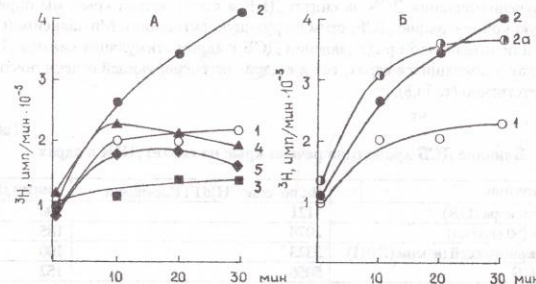


Рис.20. Влияние ингибиторов ДНК полимеразы α (А) и АТФ (Б) на синтез ДНК в ядрах, стимулированных ДСБ морского ежа. 1 - контроль (ядра без ДСБ и без ДНКазы); 2 - ядра+ДСБ+АТФ; 2а - ядра+ДСБ без АТФ; 3 - ядра+афидиколин (3мМ); 4 - ядра+N-ЭМ; 5 - ядра+агаСТР.

Влияние ингибиторов ДНК полимеразы α . Мы изучили влияние специфических ингибиторов ДНК полимеразы α на синтез ДНК, стимулируемый ДСБ эмбрионов морского ежа - это N-ЭМ, афидиколин, ага СТР (рис.20). Как следует из полученных результатов, инкубация смеси ядер с ДСБ и с любым из ингибиторов приводит к блокированию синтеза ДНК.

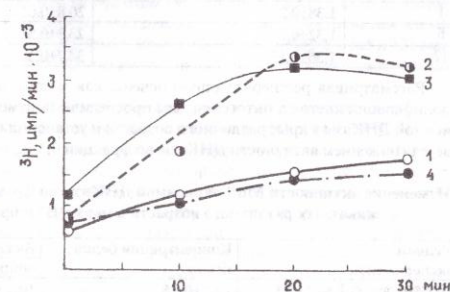


Рис.21. Зависимость включения $[^3\text{H}]$ dCTP в ядра от добавленной фракции ДСБ и антител к Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазе. 1 - ядра (контроль), 2 - ядра + ДСБ (60 мкг), 3 - ядра + ДСБ + Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимая ДНКазы, 4 - ядра + ДСБ + АТ к Ca^{2+} , Mg^{2+} -ДНКазе. АТ - антитела.

Добавление антител к Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазе в инкубационную пробу с ДСБ ведет к прекращению синтеза ДНК ядрами эмбрионов морского ежа. Синтез ДНК останавливается, если антитела добавляли вместе с ДСБ (рис.21). Угнетение синтеза ДНК антителами к Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазе в присутствии ДСБ дает возможность предположить, что инициатором синтеза является Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимая ДНКазы, а ДСБ участвуют в поддержании структуры ДНК. В частности, ДСБ способствуют релаксации определенных участков репликаона, в результате такие участки становятся чувствительными к действию ДНКаз хроматина.

11. НЕЙТРАЛЬНАЯ Mn^{2+} -ЗАВИСИМАЯ ДНКазы В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ

Одна из гипотез старения предполагает, что пусковым механизмом старения является образование одностранных разрывов в ДНК хромосом (Канунго, 1982). Причиной образования одностранных разрывов в ДНК может быть химическая модификация, действие радиации и гидролиз внутриклеточными нуклеазами (Виленик, 1970). По другой версии (Потапенко, 1994), нарушения вторичной структуры ДНК, скорее следствие, чем причина старения.

Однако они указывают на существование факторов гарантированного разрушения генома соматических клеток. Учитывая, что исследуемые ДНКазы широко представлены в структурах хроматина, было высказано предположение, что определенный вклад в "спонтанное" повреждение ДНК могут вносить ДНКазы хроматина, в частности Mn^{2+} -зависимая ДНКазы. В литературе, мы не нашли работ, посвященных изучению Mn^{2+} -зависимой ДНКазы при старении, поэтому нам представлялось интересным изучить содержание и изменение активности ДНКазы у крыс разного возраста.

В результате, было показано, что хроматин печени молодых крыс (1 мес) содержит большее количество фермента, хотя активность ДНКазы во фракции 0,4 у них была, ниже, чем у старых животных (табл.7).

Изменение активности Mn^{2+} -зависимой ДНКазы во фракции 0,4 у крыс разного возраста

Возраст, мес	Концентрация белка, мг/мл	Активность ДНКазы:	
		общая, ед/мл	удельная, ед/мг
1	1,38±0,2	20,8±0,65	15,70±0,72
6	1,32±0,1	23,3±0,55	17,21±0,38
12	1,36±0,15	34,7±0,38	25,52±0,95

Рассматривая регенерирующую печень, как модель для исследования процессов пролиферации клеток в онтогенезе, мы проследили за изменением активности Mn^{2+} -зависимой ДНКазы у крыс различного возраста и установили, что регенерация сопровождается снижением активности ДНКазы во фракции 0,4.

Изменение активности Mn^{2+} -зависимой ДНКазы во фракции 0,4 белков хроматина животных различного возраста в норме (Н) и при регенерации (Р)

Условия эксперимента	Концентрация белка мг/мл	Активность ДНКазы:	
		общая, ед/мл	удельная, ед/мг
Печень крыс, 1 мес (Н)	1,64±0,25	10,2±0,2	6,38±0,31
Печень крыс, 1 мес (Р)	1,6±0,17	7,0±0,12	4,27±0,25
Печень крыс, 12мес (Н)	1,86±0,55	33,6±0,4	12,7±0,11
Печень крыс, 12 мес (Р)	2,07±0,47	22,4±0,28	8,06±0,2

Методом ИФА показали увеличение содержания ДНКазы в регенерирующей печени молодых и старых животных по сравнению с нормой. Для молодых животных характерна более низкая активность ДНКазы хроматина как до гепатэктомии, так и после нее (табл.8). Несмотря на то, что активность ДНКазы старых животных значительно выше, по сравнению с молодыми животными, при гепатэктомии также наблюдается снижение активности, но это снижение не достигает уровня активности ДНКазы молодых (1 мес) животных ни в норме, ни при регенерации.

В связи с этими данными, можно высказать предположение, что одной из причин снижения скорости репликации ДНК у старых животных может быть гиперактивность Mn^{2+} -зависимой ДНКазы хроматина, которая, по-видимому, обусловлена возрастными изменениями в регуляции активности ДНКазы.

В качестве рабочей гипотезы для дальнейших исследований, мы позволим себе высказать предположение о том, что одним из этиологических факторов канцерогенеза при старении организма может быть относительно высокая активность ядерных ДНКаз, которые могут индуцировать новые раунды репликации ДНК в покоящихся клетках, а следовательно, и деление клеток. В работе Марии Заяк-Кайя (Zajac-Kaye, Ts'yo Paul, 1984) было показано, что введение с помощью липосом ДНКазы в клетки сирийского хомячка в условия *in vivo* приводит к появлению хромосомных aberrаций и соматических мутаций. В результате наблюдается неопластическая трансформация культивируемых клеток. При введении животным, такие мутанты обладали 100%-ной туморогенностью.

Таким образом, одним из возможных механизмов повышения адаптационных возможностей старого организма может быть контроль за активностью ДНКаз. В работе Ходарева с сотрудниками (Khodarev et al., 1995) было показано, что низкая активность ядерной Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы в фенотипически трансформирующихся клетках, в клетках подверженных апоптозу - возрастает. Авторы предположили, что уменьшение

активности фермента в трансформирующихся клетках может содействовать поддержанию (сохранению) клеточной вариабельности путем уменьшения гибели клеток по механизму апоптоза, первым и важнейшим этапом которого является активация нуклеазы (Szora, Adamic, 1993; Enari et al., 1998). Группа Nagata's (Enari et al., 1998) описала механизм апоптоза, по которому эта активность зависит от двух взаимодействующих молекул. Первая молекула - это неизвестная нуклеаза (M_r 40000)-343 аминокислоты, основной белок, экспрессируется при помощи каспазы-аспарататспецифической протеазой. Вторая молекула-это кислый белок (M_r 29000-30000), имеет две изоформы 265 и 331 аминокислота. Этот белок связывает, стабилизирует и инактивирует нуклеазу, поэтому его назвали ингибитором нуклеазы.

С позиции биологии старения апоптоз представляет большой интерес, хотя конкретная роль данного феномена в старении пока не установлена (Хансон, 1994). Вполне вероятно, что в течение жизни различные изменения условий существования клеток способны индуцировать их самодеструкцию, что будет приводить к постепенному снижению адаптационных возможностей и снижению устойчивости органов. Таким образом, апоптоз представляет собой неотъемлемую компоненту процесса старения, восприимчивую к внешним регуляторным сигналам. Оказывая влияние на апоптоз, например, через регуляцию активности ДНКазы, возможно предотвратить или замедлить многие отрицательные явления, сопровождающие старение (Hasel et al., 1995). Углубление знаний в этой области откроет новые пути воздействия на клеточный гомеостаз нормальных тканей и механизмы элиминации потенциально опасных клонов.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны аналитический и препаративный методы выделения ядерных ДНКаз из клеток печени крыс и эмбрионов морского ежа. Выделены электрофоретически гомогенные препараты Mn^{2+} -зависимой ДНКазы из ядер печени крыс и Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы из ядер эмбрионов морского ежа.

Дана подробная характеристика физико-химических свойств Mn^{2+} -зависимой ДНКазы. Установлено, что Mn^{2+} -зависимая ДНКаза является эндонуклеазой, строго специфичной к денатурированной ДНК, которая активируется ионами Mn^{2+} .

2. Выделены и охарактеризованы ДНК-связывающие белки ядер печени крыс, способные стимулировать активность Mn^{2+} -зависимой ДНКазы в условиях *in vitro*. Стимулирующее действие ДСБ обусловлено взаимодействием белков с ДНК, в результате чего повышается чувствительность ДНК к ДНКазам.

3. Получены принципиально новые данные о распределении Mn^{2+} -зависимой ДНКазы в структурах ядра. Впервые методом электронной иммуногистохимии показано, что ДНКаза распределяется по всей длине хроматиновых фибрилл и локализуется в нуклеосомах и линкерной ДНК. Ее содержание зависит от степени активации хроматина.

4. Установлено, что Mn^{2+} -зависимая ДНКаза печени крыс и Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимая ДНКаза эмбрионов морского ежа могут инициировать синтез ДНК в покоящихся ядрах.

5. Изучена динамика активности ДНКазы хроматина покоящихся и пролиферирующих клеток печени. Показано, что в клетках, находящихся в стадии пролиферации, активность ДНКазы хроматина понижается в 2,0-2,5 раза. Снижение активности ДНКазы обусловлено ингибированием фермента. Установлено, что при синтезе ДНК наблюдается параллельное увеличение содержания ДНКазы в ядрах.

6. Ядра клеток печени старых животных характеризуются более высокой удельной активностью ДНКаз. Высокая активность ДНКаз обусловлена не увеличением содержания фермента, а изменениями в регуляции его активности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Терпиловская О.Н., Иванов В.А., Абрамова З.И., Белова М.М. Белки ядер головного мозга крыс в онтогенезе //Нейрохимия.-1983.-Т.2, №2.-С.164-172.
2. Абрамова З.И., Винтер В.Г., Зоткина Н.Л., Белова М.М., Хамидуллина Н.Г. Определение локализации негистоновых белков хроматина печени крыс иммунологическими методами //Тез. докл. VIII Всесоюзного симпозиума "Структура и функции клеточного ядра", 15-18 мая.-Пушино, 1984.-С.104.
3. Белова М.М., Аскарова А.Н., Абрамова З.И. Использование иммунохимических методов для изучения негистоновых белков хроматина // Тез. докл. VIII Всесоюзного симпозиума "Структура и функции клеточного ядра", 15-18 мая.-Пушино, 1984.-С.105-106.
4. Винтер В.Г., Абрамова З.И., Белова М.М., Дебус Н., Хамидуллина Н.Г., Зоткина Н.Л. Внутриклеточная локализация нейтральной Mn^{2+} -зависимой ДНКазы печени крыс //Тез. докл. VIII объединенного симпозиума биохимических обществ СССР-ГДР "Проблемы современной биохимии и биотехнологии", 23-25 апреля 1985.-Рига, 1985.-С.70.
5. Винтер В.Г., Аскарова А.Н., Абрамова З.И., Белова М.М., Зоткина Н.Л., Шарипова Ф.Р., Хамидуллина Н.Г. Использование иммунохимических методов для изучения нуклеаз // В сб.: "Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование", Рига, 1985.-С.56-59.
6. Абрамова З.И., Белова М.М., Винтер В.Г., Зоткина Н.Л. Сравнительное изучение методов фиксации при определении локализации нейтральной ДНКазы хроматина в тканях //Тез. докл. Всесоюзного симпозиума "Криогенные методы в электронной микроскопии", 11-13 сент. 1985.-Пушино, 1985.-С.85-86.
7. Зоткина Н.Л., Хамидуллина Н.Л., Абрамова З.И., Белова М.М., Винтер В.Г. Участие дезоксирибонуклеаз в синтезе ДНК //Тез докл. V Всесоюзного биохимического съезда. Киев: Наука.-1986.-Т.2.-С.410-411
8. Абрамова З.И., Зоткина Н.Л., Винтер В.Г. Изучение локализации нейтральной Mn^{2+} -зависимой ДНКазы ядер печени крыс в хроматине методом иммунной электронной микроскопии //Каз.ун-т.-Казань, 1987.-18с.-Деп. в ВИНТИ 22.05.87, № 3713-B87
9. Абрамова З.И., Дебус., Зоткина Н.Л., Винтер В.Г. Ультраструктурная локализация нейтральной ДНКазы хроматина в гепатоцитах //Тез докл. IX Всесоюзного симпозиума "Структура и функции клеточного ядра", 25-27 мая.-Черноголовка, 1987.-С.141
10. Котляр Е.Ю., Белова М.М., Галкин В.В., Абрамова З.И., Рассказов В.А., Винтер В.Г. Изучение влияния на синтез ДНК ДНК-связывающего белка и моноклональных антител к Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазе //Тез докл IX Всесоюзного симпозиума "Структура и функции клеточного ядра", 25-27 мая.-Черноголовка, 1987.-С.154
11. Винтер В.Г., Хамидуллина Н.Л., Абрамова З.И., Шумилов Ю.Н., Рассказов В.А. Влияние Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы на синтез ДНК в ядрах эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* //Биохимия.-1987.-Т.52, №12.-С.2009-2314.
12. Winter V.G., Askarova A.N., Abramjva Z.I., Debus N., Chamidullina N.G., Zotkina N. The depends of DNA-replication on the activity of neutral Mn-dependent chromatin DNAase //In: Ninth Joint Symposium of the Biochemical Societies of the GDR and USSR. 5-7 Sept, 1987. Abstract. Jena, GDR.-1987.-P.154
13. Абрамова З.И., Зоткина Н.Л., Белова М.М., Хамидуллина Н.Г., Винтер В.Г. Локализация нейтральной Mn^{2+} -зависимой ДНКазы в гепатоцитах. Иммунофлуоресцентное окрашивание //Цитология.-1988.-Т.30, № 3.-С.349-354.
14. Абрамова З.И., Дебус., Винтер В.Г. Изучение ультраструктурной локализации нейтральной ДНКазы хроматина в гепатоцитах методом иммунной электронной микроскопии с помощью коллоидного золота //Биол.науки.-1988.-№ 7.-С.98-105.
15. Winter V.G., Askarova A.N., Abramjva Z.I., Debus N., Chamidullina N.G., Zotkina

N.L., Belova M.M. The depends of DNA-replication on the activity of neutral Mn-dependent chromatin DNAase //14th International Congress of Biochemistry (FEBS), Juli, 10-15 1988.-P.208 /Prague Choslowakis Abstra.

16. Винтер В.Г., Абрамова З.И., Шумилов Ю.Н., Рассказов В.В., Котляр Е.Ю., Хамидуллина Н.Г. Сравнительное изучение действия различных ДНКаз на синтез ДНК в изолированных ядрах эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* //Каз.ун-т.-Казань, 1988.-18с.-Деп. в ВИНТИ 16.11.88, № 8157-B88
17. Котляр Е.Ю., Белова М.М., Винтер В.Г., Абрамова З.И., Нейфах А.А., Буренкова Т.А., Корж В.А. Участие ДНКаз в эмбриональном развитии выюна и морского ежа // Сп.б. Цитология.-1990.-Т.32, №1.-С.1108-1109.
18. Абрамова З.И., Дебус., Зоткина Н.Л., Винтер В.Г. Определение взаимодействия нейтральной Mn^{2+} -зависимой ДНКазы с ДНК методом иммунной электронной микроскопии //Цитология.-1990.-Т.32, №1.-С.94-96.
19. Котляр Е.Ю., Белова М.М., Хамаде Ф., Абрамова З.И., Винтер В.Г. Распределение Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы эмбрионов морского ежа при фракционировании хроматина клеток, синтезирующих ДНК //Тез. Всесоюзного симпозиума "Структура и функции клеточного ядра" -М., 1990.-С.98.
20. Зоткина Н.Л., Зо Сын Ха, Абрамова З.И., Батурина И.Д., Винтер В.Г. Препаративный метод выделения и иммунохимические свойства нейтральной Mn^{2+} -зависимой ДНКазы хроматина //Каз.ун-т.-Казань, 1990.-28с.-Деп. в ВИНТИ 18.12.90, № 6290-B90.
21. Абрамова З.И., Косарева Т.И., Винтер В.Г. Изучение взаимодействия Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* с ДНК методом иммунной электронной микроскопии коллоидного золота //Каз.ун-т.-Казань, 1991.-23с.-Деп. в ВИНТИ 21.03.91, № 1258-B91.
22. Буторина О.К., Абрамова З.И., Семенов В.В., Винтер В.Г., Мальцев С.В. Одно- и двунитевые разрывы ДНК в лейкоцитах периферической крови больных бронхиальной астмой //В сб.: "Генетика человека и патология". Томск: Изд-во Томского ун-та, 1992.-С.54-55.
23. Винтер В.Г., Зоткина Н.Л., Зо Сын Ха, Абрамова З.И. Очистка и иммунохимическая характеристика нейтральной Mn^{2+} -зависимой ДНКазы хроматина //Биохимия.-1993.-Т.58, №9.-С.1394-1402.
24. Абрамова З.И., Лоскутова М.Г., Гадиева Р.М., Винтер В.Г. Выделение и некоторые свойства ДНК-связывающего белка ядер печени крыс //Каз.ун-т.-Казань, 1994.-34с.-Деп. в ВИНТИ 06.04.94, № 827-B94.
25. Абрамова З.И., Косарева Т.И., Винтер В.Г. Взаимодействие Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой ДНКазы эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* с ДНК. Иммунное электронно-микроскопическое изучение //Цитология.-1995.-Т.37, № 9/10.-С.894-900.
26. Abramova Z.I., Zotkina N.L. Subnuclear localization of neutrel Mn-dependent DNAse //23rd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Aug. 13-18, 1995.- Basel, Switzerland, 1995.-P.23.15.
27. Vinter V.G., Abramova Z.I. Electron-microscopic study of neutrel Mn-dependent DNAse and Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent DNAse: localization, an immunohistochemical approach // Karadeniz Tip Dergisi.-1995.-V.8, N.4.-P.207.
28. Loscutova M.G., Faslieva R.M., Abramova Z.I., Modulated effect of DNA-binding proteins from liver cell nucleus on hidrolisis of native DNA by neutral Mn^{2+} -dependent DNAse //Karadeniz Tip Dergisi.-1995.-V.8, N.4.-P.212.
29. Абрамова З.И., Лоскутова М.Г., Винтер В.Г. Электронное иммуногистохимическое исследование ДНКаз хроматина и ДНК-связывающих белков хроматина печени крыс //Тез. докл. "Второго съезда биохимического общества Российской академии наук", Москва, 19-23 мая, 1997.-Пушино, 1997.-ч.1.-С.81-82.

Корректурa автора
Тираж 100 экз.
Подп. в печать 25.03.99

Уч.-изд.л. 2,25
Формат 60х90, 1/16
Печать RISO

Отпечатано с готового оригинал-макета
в ООО «Олитех», 420094, г.Казань, ул.Чуйкова, 2